

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>B 2729 PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 99/ 03291</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>12/05/1999</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>13/05/1998</b>
Anmelder  <b>MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSC</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 4



wie vom Anmelder vorgeschlagen



keine der Abb.



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C12N15/29 C07K14/415

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>2</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 06669 A (UNIV CALIFORNIA) 27. Februar 1997 (1997-02-27) Seite 3, Zeile 15-23, Seite 8; claims ---	1-4, 8, 10-13, 17
Y	HERBERS, K., ET AL. : "expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves" THE PLANT JOURNAL, Bd. 12, Nr. 5, 1997, Seiten 1045-1056, XP002125082 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument --- -/--	1-8, 10-17



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>2</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Dezember 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/01/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P. B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S



## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>HERBERS, K., ET AL. : "systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway"</p> <p>THE PLANT CELL, Bd. 8, Mai 1996 (1996-05), Seiten 793-803, XP002125083</p> <p>Zusammenfassung, Seite 94, linke Spalte; Seiten 799, 800 ; Abb. 2 und 3</p> <p>----</p>	1-8, 10-17
A	<p>SCHMITZ, J., ET AL. : "in situ localisation of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants"</p> <p>VIROLOGY, Bd. 235, Nr. 2, September 1997 (1997-09), Seiten 311-322, XP002125084</p> <p>in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>----</p>	1-18
A	<p>TACKE, E., ET AL. : "mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 KDa phosphoprotein of Potato Leafroll Luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions"</p> <p>VIROLOGY, Bd. 197, 1993, Seiten 274-282, XP002125085</p> <p>in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>----</p>	1-18
A	<p>SOKOLOVA, M., ET AL. : "the potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C "</p> <p>FEBS LETTERS, Bd. 400, Nr. 2, Januar 1997 (1997-01), Seiten 201-205, XP002125086</p> <p>in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-18



# I INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/03291

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9706669 A	27-02-1997	AU 6953496 A	12-03-1997







PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup>:

C12N 15/82, 15/29, C07K 14/415

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/58653

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum: 18. November 1999 (18.11.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/03291

(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Mai 1999 (12.05.99)

(30) Prioritätsdaten:  
98108726.5 13. Mai 1998 (13.05.98) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):  
MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG  
DER WISSENSCHAFTEN, E.V. [DE/DE]; Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ROHDE, Wolfgang  
[DE/DE]; Untergasse 29, D-35418 Buseck (DE). PRÜFER,  
Dirk [DE/DE]; Hackländer Strasse 15, D-50825 Köln  
(DE). TACKE, Eckhard [DE/DE]; Allmelingstrasse  
25b, D-29574 Ebstorf (DE). PASEMANN, Peter  
[DE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 10, D-50829 Köln (DE).  
SALAMINI, Francesco [IT/DE]; Carl-von-Linné-Weg 1,  
D-50829 Köln (DE).

(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675  
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE,  
SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD,  
SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG,  
KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen  
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen  
eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-  
richts: 9. März 2000 (09.03.00)

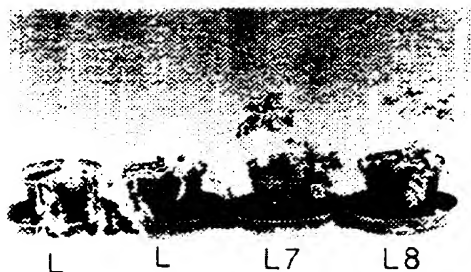
(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PLANTS HAVING AN INCREASED TOLERANCE AGAINST DROUGHT AND/OR  
FUNGAL ATTACK AND/OR INCREASED SALT CONCENTRATIONS AND/OR EXTREME TEMPERATURE BY THE  
EXPRESSION OF PLASMODESMATA-LOCALIZED PROTEINS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERZEUGUNG VON PFLANZEN MIT ERHÖHTER TOLERANZ GEGEN TROCKENHEIT  
UND/ODER PILZBEFALL UND/ODER ERHÖHTE SALZKONZENTRATIONEN UND/ODER EXTREME TEM-  
PERATUR DURCH DIE EXPRESSION PLASMODESMEN-LOKALISIERTER PROTEINE

A



B



(57) Abstract

The invention relates to the use of nucleic acids which code a (poly)peptide with an intrinsic affinity to plasmodesmata, to the production of plants or parts thereof having an increased tolerance against drought and/or fungal infections and/or increased salt concentrations and/or extreme temperature (heat, cold), and to corresponding methods. According to the invention, a plant, a plant tissue or a plant cell is advantageously transfected with the nucleic acid. The nucleic acid preferably codes a virus-coded transport protein which, in an especially preferred embodiment, is a derivative of the pr17 protein with a hydrophilic N-terminal extension.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodieren, zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhten Salzkonzentrationen und/oder extreme Temperatur (Hitze, Kälte) sowie entsprechende Verfahren. Vorteilhafterweise transfiziert man dabei eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit der Nukleinsäure. Vorzugsweise kodiert die Nukleinsäure ein Virus-kodiertes Transportprotein, das in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein Derivat des pr17-Proteins mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

## PCT/EP 99/03291

IPC 6 C12N15/82 C12N15/29 C07K14/415

IPC 6 C12N C07K

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

Y	HERBERS, K., ET AL. : "expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves" THE PLANT JOURNAL, vol. 12, no. 5, 1997, pages 1045-1056, XP002125082 cited in the application the whole document	1-8, 10-17
---	---	---------------

-/-

☒ Patent family members are listed in annex.

"&" document member of the same patent family

11/01/2000

Holtorf, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/EP 99/03291

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HERBERS, K., ET AL. : "systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway" THE PLANT CELL, vol. 8, May 1996 (1996-05), pages 793-803, XP002125083 Abstract, page 94, left hand column; pages 799, 800; figures 2 and 3	1-8, 10-17
A	SCHMITZ, J., ET AL. : "in situ localisation of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants" VIROLOGY, vol. 235, no. 2, September 1997 (1997-09), pages 311-322, XP002125084 cited in the application the whole document	1-18
A	TACKE, E., ET AL. : "mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 KDa phosphoprotein of Potato Leafroll Luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions" VIROLOGY, vol. 197, 1993, pages 274-282, XP002125085 cited in the application the whole document	1-18
A	SOKOLOVA, M., ET AL. : "the potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C " FEBS LETTERS, vol. 400, no. 2, January 1997 (1997-01), pages 201-205, XP002125086 cited in the application the whole document	1-18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/03291

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9706669 A	27-02-1997	AU 6953496 A	12-03-1997



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Alderzeichen

PCT/EP 99/03291

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/82 C12N15/29 C07K14/415

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 06669 A (UNIV CALIFORNIA) 27. Februar 1997 (1997-02-27) Seite 3, Zeile 15-23, Seite 8; claims	1-4, 8, 10-13, 17
Y	HERBERS, K., ET AL. : "expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves" THE PLANT JOURNAL, Bd. 12, Nr. 5, 1997, Seiten 1045-1056, XP002125082 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-8, 10-17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Dezember 1999

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

11/01/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Holtorf, S

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	HERBERS, K., ET AL. : "systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway" THE PLANT CELL, Bd. 8, Mai 1996 (1996-05), Seiten 793-803, XP002125083 Zusammenfassung, Seite 94, linke Spalte; Seiten 799, 800 ; Abb. 2 und 3	1-8, 10-17
A	SCHMITZ, J., ET AL. : "in situ localisation of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants" VIROLOGY, Bd. 235, Nr. 2, September 1997 (1997-09), Seiten 311-322, XP002125084 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-18
A	TACKE, E., ET AL. : "mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 KDa phosphoprotein of Potato Leafroll Luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions" VIROLOGY, Bd. 197, 1993, Seiten 274-282, XP002125085 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-18
A	SOKOLOVA, M., ET AL. : "the potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C " FEBS LETTERS, Bd. 400, Nr. 2, Januar 1997 (1997-01), Seiten 201-205, XP002125086 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-18



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/03291

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied( r) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9706669 A	27-02-1997	AU 6953496 A	12-03-1997



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 99/58653</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 18. November 1999 (18.11.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/03291 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 12. Mai 1999 (12.05.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 98108726.5 13. Mai 1998 (13.05.98) EP <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN, E.V. [DE/DE]; Berlin (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> ROHDE, Wolfgang [DE/DE]; Untergasse 29, D-35418 Buseck (DE). PRÜFER, Dirk [DE/DE]; Hackländer Strasse 15, D-50825 Köln (DE). TACKE, Eckhard [DE/DE]; Allmelingstrasse 25b, D-29574 Ebstorf (DE). PASEMANN, Peter [DE/DE]; Carl-von-Linné-Weg 10, D-50829 Köln (DE). SALAMINI, Francesco [IT/DE]; Carl-von-Linné-Weg 1, D-50829 Köln (DE). <b>(74) Anwalt:</b> VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR PRODUCING PLANTS HAVING AN INCREASED TOLERANCE AGAINST DROUGHT AND/OR FUNGAL ATTACK AND/OR INCREASED SALT CONCENTRATIONS AND/OR EXTREME TEMPERATURE BY THE EXPRESSION OF PLASMODESMATA-LOCALIZED PROTEINS  <b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR ERZEUGUNG VON PFLANZEN MIT ERHÖHTER TOLERANZ GEGEN TROCKENHEIT UND/ODER PILZBEFALL UND/ODER ERHÖHTE SALZKONZENTRATIONEN UND/ODER EXTREME TEM- PERATUR DURCH DIE EXPRESSION PLASMODESMEN-LOKALISIERTER PROTEINE  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to the use of nucleic acids which code a (poly)peptide with an intrinsic affinity to plasmodesmata, to the production of plants or parts thereof having an increased tolerance against drought and/or fungal infections and/or increased salt concentrations and/or extreme temperature (heat, cold), and to corresponding methods. According to the invention, a plant, a plant tissue or a plant cell is advantageously transfected with the nucleic acid. The nucleic acid preferably codes a virus-coded transport protein which, in an especially preferred embodiment, is a derivative of the pr17 protein with a hydrophilic N-terminal extension.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodieren, zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhten Salzkonzentrationen und/oder extreme Temperatur (Hitze, Kälte) sowie entsprechende Verfahren. Vorteilhafterweise transfiziert man dabei eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit der Nukleinsäure. Vorzugsweise kodiert die Nukleinsäure ein Virus-kodiertes Transportprotein, das in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein Derivat des pr17-Proteins mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen mit erhöhter Toleranz gegen  
Trockenheit und/oder Pilzbefall und/oder erhöhte Salzkonzentrationen  
und/oder extreme Temperatur durch die Expression plasmodesmen-  
lokalisierter Proteine**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodieren, zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhte Salzkonzentrationen und/oder extreme Temperaturen (Kälte, Hitze) sowie entsprechende Verfahren. Vorteilhafterweise transfiziert man dabei eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit der Nukleinsäure. Vorzugsweise kodiert die Nukleinsäure ein Virus-kodiertes Transportprotein, das in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein Derivat des pr17-Proteins mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.

Im folgenden werden mehrere Dokumente zitiert, deren Offenbarungsgehalt hiermit durch Bezugnahme enthalten ist und deren technische Lehre im Sinne der vorliegenden Erfindung angewendet werden kann.

Ein Ziel der klassischen Pflanzenzüchtung ist die Schaffung von ertragreichen Sorten, die eine erhöhte Toleranz gegenüber Umweltfaktoren aufweisen bzw. gegenüber Streßfaktoren resistent sind. Diese Streßfaktoren können sowohl biotischer (Insekten, Viren, Pilze etc.) als auch abiotischer Natur sein (extreme Temperaturen, Salz, Trockenheit). Während Wildpflanzen an streßdominierten Standorten sich an die extremen Lebensbedingungen adaptiert haben, beschränken Dürre, Hitze oder Salinität des Bodens die Möglichkeiten zum Anbau von Kulturpflanzen in solchen Gebieten. Andererseits erleidet die Landwirtschaft auch an anderen Standorten große Einbußen durch abiotischen Streß, wie das Beispiel des Dürrejahres 1983 in den USA gezeigt hat: Nahezu die Hälfte der gesamten Maisernte und ein Drittel des erwarteten Sojaertrags wurden durch die anhaltende Trockenheit vernichtet.

Allen genannten abiotischen Streßbedingungen ist gemein, daß sie das intrazelluläre Wassergleichgewicht stören. Pflanzen können sich jedoch in gewissen Grenzen auf Streßbedingungen einstellen (Bohnert, (1995) *Plant Cell* **7**: 1099-1011). So sind z.B. Proteine sowie Metaboliten des pflanzlichen Stoffwechsels wie Zuckeralkohole, Prolin oder Glyzinbetain als in der Folge von abiotischem Streß akkumulierende Osmoregulatoren identifiziert worden. Darauf basierend wurden verschiedene Strategien entwickelt, durch gentechnologische Veränderungen transgene Pflanzen mit erhöhter Toleranz gegenüber derartigen Faktoren bzw. erhöhter Streßresistenz zu erzeugen (Übersichtsartikel von Holmberg und Bülow (1998) *Trends Plant Science* **3**: 61-66). Ein Beispiel für pflanzliche Proteine als Antistress-Faktoren sind die sogenannten LEA (late embryogenesis abundant)-Proteine, deren erhöhte Expression mit physiologischem und Umweltstress korreliert und die eine Schutzfunktion für die Pflanze unter extremen Streßbedingungen darstellen (siehe z.B. Chandler (1994) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 113-141). Die gentechnische Veränderung von Reis mit Hilfe des Gersten-LEA-Gens HVA1 resultierte tatsächlich in einer erhöhten Toleranz gegenüber Trockenheit und Salz (Xu (1996) *Plant Physiology* **110**: 249-257). Andere Arbeiten zur Expression eines LEA-Gens in einem heterologen System konnten diese Befunde nicht unterstützen (Iturriaga (1992) *Plant Mol. Biol.* **20**: 555-558).

Unter den als Antistressfaktoren oder Osmoprotektoren identifizierten pflanzlichen Metaboliten befindet sich das Glyzinbetain, dessen Wirksamkeit z.B. im Mais nachgewiesen wurde (Saneoka, (1995) *Plant Physiol.* **107**: 631-638). An der Synthese des Glyzinbetains in pflanzlichen Chloroplasten ist die Betainaldehyd-Dehydrogenase (BADH) beteiligt (Rhodes, (1993) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 357-384). Transgene Tabakpflanzen, welche eine bakterielle BADH (Holmstrom, (1994) *Plant. J.* **6**: 749-758) oder eine pflanzliche BADH exprimieren (Rathinasabapathi, (1994) *Planta* **193**: 155-162), zeigten die erwartete Resistenz gegen Betainaldehyd durch Konversion zu Glyzinbetain in Mengen, die in gestreßten Pflanzen gemessen werden. Über eine erhöhte Streßtoleranz dieser Pflanzen wurde jedoch nicht berichtet.

Zuckerderivate wie Zuckeralkohole oder Fruktane werden offensichtlich ebenfalls bei der Streßantwort der Pflanze in erhöhtem Maße gebildet und akkumuliert. Die Erhöhung des Mannitol-Spiegels in transgenen Tabakpflanzen durch Expression einer bakteriellen Mannitol-1-phosphate-Dehydrogenase bewirkte eine erhöhte Salztoleranz (Tarczynski, (1993) Science **259**: 508-510). Gleichermäßen zeigten transgene Tabakpflanzen mit erhöhtem Fruktangehalt im Vergleich mit Kontrollpflanzen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Trockenheit (Pilon-Smith, (1995) Plant Physiol. **107**: 125-130).

Allen diesen bisher genannten gentechnologischen Verfahren ist gemein, daß sie eine erhöhte Synthese von Osmoprotektoren in der Pflanze zur Folge haben, wodurch z.B. das normale Wachstum der Pflanze beeinträchtigt werden kann (siehe Rathinasabapathi, op. cit.). In anderen Fällen werden bakterielle Gene in der Pflanze exprimiert, was nicht notwendigerweise mit einer optimalen Expression und damit einer suboptimalen Streßbewältigung einhergeht. Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe war somit, ein Verfahren bereitzustellen, Pflanzen mit gesteigerter Streßresistenz bereitzustellen, die dennoch ein im wesentlichen normales Wachstum aufweisen. Vorzugsweise sollte diese Streßresistenz (oder Toleranz) sich auf biotische wie auch abiotische Streßfaktoren beziehen. Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung einer Nukleinsäure, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhten Salzkonzentrationen und/oder extreme Temperaturen; d.h. Kälte und/oder Hitze. Üblicherweise wird erfindungsgemäß eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit einer derartigen Nukleinsäure nach konventionellen Verfahren transfiziert.

Alle höheren Pflanzen zeichnen sich dadurch aus, daß sie zur Photosynthese von Zuckern und deren Derivaten befähigt sind, die wie oben erwähnt als Osmoprotektoren unter Streßbedingungen dienen können. Die intrazelluläre

Konzentration der Zucker und Zuckerderivate - vor allem in den Blättern zum Schutz der Photosynthese-aktiven Chloroplasten – wurde erfindungsgemäß in überraschend einfacher Weise durch die vorstehend gekennzeichnete Maßnahme gelöst. Von besonderem Vorteil neben der Tatsache, daß diese Maßnahme für den Fachmann technisch in einfacher Weise zu bewerkstelligen ist, ist ferner, daß erfindungsgemäß die Streßresistenz mit einem in vielen und möglicherweise sogar allen Pflanzen gültigen Mechanismus erhöht werden kann. Überraschenderweise konnte mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die pflanzliche Toleranz sowohl gegenüber abiotischen wie auch gegenüber biotischen Faktoren erhöht werden.

Der Begriff "erhöhte Salzkonzentration" bezieht sich auf Salzkonzentrationen im Boden, die zu einer erhöhten Ionenkonzentration in der Pflanze führen, die dann zu vermindertem Wachstum führt. Die absoluten Salzkonzentrationen im Boden, die als erhöht anzusehen sind, sind für unterschiedliche Pflanzen verschieden, können vom Fachmann aber nach konventionellen Verfahren bestimmt werden, z.B. anhand des Offenbarungsgehaltes von Greenway und Munns (1980) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.

Zur Expression der Nucleinsäure, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen codiert, in pflanzlichen Zellen ist diese mit regulatorischen Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Sinnvolle Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression.

Ferner ist gewöhnlich eine Transkriptions-Terminationssequenz vorhanden, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dienen kann, dem eine Funktion bei der Stabilisierung



der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente, z.B. der Terminator des Octopinsynthesegens aus Agrobakterien, sind in der Literatur beschrieben (vgl. Giel, EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Promotor der 35S CaMV Promotor.

Neben der Nucleinsäure, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen codiert, kann die Pflanze, die in einem der erfindungsgemäßen Verfahren oder Verwendungen benutzt oder hergestellt wird, weitere rekombinante DNA-Moleküle enthalten, die z. B. für den Pflanzenschutz oder Qualitätssteigerungen der Pflanze oder deren Ernteprodukte benutzt werden können. Beispiele für Pflanzenschutzmaßnahmen sind: (i) Herbizidtoleranz (DE-A-3701623; Stalker (1988) Science 242, 419), (ii) Insektenresistenz (Vaek (1987) Plant Cell 5, 159-169), (iii) Virusresistenz (Powell (1986) Science 232, 738-743) und (vi) Ozon-resistenz (Van Camp (1994) BioTech. 12, 165-168). Beispiele für Qualitätssteigerungen sind: (i) Erhöhung der Haltbarkeit von Früchten (Oeller (1991) Science 254, 437-439), (ii) Erhöhung der Stärkeproduktion in Kartoffelknollen (Stark (1992) Science 242, 419), (iii) Veränderung der Stärke- (Visser (1991) Mol. Gen. Genet. 225, 289-296) und Lipidzusammensetzung (Voelker (1992) Science 257, 72-74) und (iv) Produktion pflanzenfremder Polymere (Porier (1992) Science 256, 520-523).

Grundvoraussetzung für die Erzeugung transgener Pflanzen ist die Verfügbarkeit geeigneter Transformationssysteme. Zur Transformation stehen derzeit mehrere Verfahren zur Verfügung. Die am häufigsten eingesetzte Methode zur Transformation dikotyledoner Pflanzen ist der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer. Hierbei wird die natürliche Fähigkeit des Bodenbakteriums ausgenutzt, genetisches Material in das pflanzliche Genom zu integrieren. Weitere geeignete Verfahren sind beispielsweise Protoplasten-Transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, Elektroporation, Sonikation oder Mikroinjektion sowie die Transformation intakter Zellen oder Gewebe durch Mikro- oder Makroinjektion in Gewebe oder Embryonen, Gewebeelektroporation, Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, Vakuuminfiltration von Samen und biolistischer

Gentransfer (zur Übersicht: siehe z. B. Potrykus, *Physiol. Plant* (1990), 269 - 273 und Christou (1996) *Trends in Plant Science* 1, 423-431).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan, *Plant Mol. Biol.* 22 (1993), 491-506; Hiei, *Plant J.* 6 (1994), 271-282; Bytebier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 5345 - 5349; Raineri, *Bio/Technology* 8 (1990), 33 - 38; Gould, *Plant Physiol.* 95 (1991), 426 - 434; Mooney, *Plant, Cell Tiss. & Org. Cult.* 25 (1991), 209 - 218; Li, *Plant Mol. Biol.* 20 (1992), 1037 - 1048). Die Methoden zur Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Christou (1996) *Trends in Plant Science* 1, 423-431; Willmitzer, L., 1993 *Transgenic plants*. In: *Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise* (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge). Drei der oben genannten Transformationssysteme konnten in der Vergangenheit für verschiedene Getreide etabliert werden: die Elektroporation von Gewebe, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer durch Partikel-Beschuß in regenerierbare Gewebe und Zellen (zur Übersicht: Jähne, *Euphytica* 85 (1995), 35 - 44). Die Transformation von Weizen wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (zur Übersicht: Maheshwari, *Critical Reviews in Plant Science* 14 (2) (1995), 149 - 178). Der Fachmann kann auf die Marker zur Selektion transformierter Pflanzenzellen, Pflanzengewebe und Pflanzen zurückgreifen. Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden. Der Fachmann kann z.B. auch auf molekularbiologische Methoden wie PCR zurückgreifen, um diese Pflanzen zu identifizieren. Auf der anderen Seite kann der Fachmann natürlich auch, z.B. nach Selbstung oder Rückkreuzung gegen den Elter, Samen solcher Pflanzen auf selektiven Medien auslegen und anhand der Keimfähigkeit dieser Samen oder Überleben der Pflanzen in einem späteren Stadium der Entwicklung (abhängig vom gewählten Promotor) rückschließen, ob die Pflanzen transgen sind oder nicht. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich

prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen.

Da unabhängig vom Transformationsverfahren nur wenige Zellen die gewünschten Eigenschaften tragen, wird in herkömmlicher Weise neben dem Zielgen ein selektionierbarer Marker in das pflanzliche Genom integriert, der die Identifizierung transgener Zellen ermöglicht. Derzeit werden zur Selektion transformierter Pflanzenzellen vornehmlich Gene eingesetzt, die eine Herbizid- oder Antibiotikatoleranz vermitteln. Geeignete Resistenzgene sind beispielsweise das bar-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*, das Resistenz gegen das Totalherbizid Phosphinothricin vermittelt (De Block (1987) EMBO J. 6, 2513-2518) oder das nptII-Gen aus dem Transposon Tn5 von *Escherichia coli*, das Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin bewirkt (Herrera-Estrella (1983) EMBO J. 2, 987-995). Weitere Selektionssysteme sind z. B. Expression einer Mannose-6-Phosphat Isomerase und positive Selektion auf Mannose-haltigen Nährmedien (WO 94/20627). Ein weiteres Verfahren nutzt die Fähigkeit einer Deaminase aus *Aspergillus terreus* aus, das Insektizid Blasticidin S zu detoxifizieren (Tamura (1995) Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 2336-2338). Natürlich weiß der Fachmann, daß der Selektionsmarker nicht unbedingt in dem Vektor, der das rekombinante DNA-Molekül enthält, anwesend sein muß, sondern auch mit diesen co-transformiert werden kann (Lyznik (1989) Plant Mol. Biol. 13, 151-161; Peng (1995) Plant Mol. Biol. 27, 91-104). Diese Möglichkeit bietet sich zum Beispiel an, wenn keine physikalische Kopplung des Markergens und der zu übertragenden Information gewünscht wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung wird ferner eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert. Die Regeneration der Pflanzen kann nach üblichen und dem Fachmann geläufigen Verfahren erfolgen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung werden im Anschluß an den Regenerationsschritt ferner weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der regenerierten Pflanze erzeugt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein.

Die Expression von pflanzenviralen Proteinen, die am Transport viraler Information von Zelle zu Zelle beteiligt sind (Transportproteine), beeinflussen auch den Transport bzw. Metabolismus von Stärke, Zuckern und Zuckerderivaten derart, daß sie während der Lichtperiode in den Photosynthese-aktiven Blättern der Pflanze zu höheren als normalen Werten akkumulieren (vgl. z.B. Lucas (1993) *Planta* **190**: 88-96; Olesinski (1995), *Planta* **197**: 118-126; Olesinski, (1996) *Plant Physiol.* **111**: 541-550; Herbers (1997), *Plant J.* **12**: 1045-1056; Almon (1997), *Plant Physiol.* **115**: 1599-1607). Die Erhöhung der pflanzlichen Toleranz gegenüber den vorstehend genannten Umweltfaktoren durch die Expression derartiger Proteine mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen, den Verbindungskanälen benachbarter Zellen in Pflanzen gemäß dieser bevorzugten Ausführungsform der Erfindung war aus dem Stand der Technik nicht ohne weiteres abzuleiten. Die eigentliche Funktion von virus-kodierten Transportproteinen (TP) besteht nämlich darin, den Transport der genetischen Information eines Virus von Zelle zu Zelle zu gewährleisten und so die Ausbreitung eines Virus vom ursprünglichen Infektionsort in die gesamte Pflanze zu ermöglichen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV) Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon.

Wie in den Beispielen erläutert wurden das TP des Kartoffel-Blattrollvirus (potato leafroll virus, PLRV) sowie die Kulturpflanze Kartoffel als Modellsystem gewählt. Das PLRV-TP, das ein Merkmal einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens darstellt, ist ein 17 kDa großes Protein (pr17), das für den Transfer der genomischen RNA von Zelle zu Zelle verantwortlich ist. Es wird durch das offene Leseraster (ORF) ORF4 kodiert; dieses Gen ist innerhalb des ORF3, des Gens für das virale Kapsidprotein CP, gelegen, jedoch in einem anderen Leseraster. Das Protein besitzt eine aminoternale Domäne zur Bildung von Homopolymeren (Tacke (1993), *Virology* **197**: 274-282.) und eine carboxyterminale Domäne zur Bindung einzelsträngiger Nukleinsäuren (Tacke (1991), *J. Gen. Virol.*

72: 2035-2038). Dieses Protein, das *in planta* phosphoryliert vorliegt (Tacke (1993), op. cit.; Sokolova (1997), FEBS Lett. **400**: 201-205), wird siebenfach stärker exprimiert als das virale Hüllprotein (Tacke (1990), J. Gen. Virol. **71**: 2265-2272). In PLRV-infizierten sowie in pr17-transgenen Kartoffelpflanzen ist das pr17 vorwiegend an den Plasmoden zwischen Siebelement und Geleitzelle des Phloems lokalisiert (Schmitz (1997), Virology **235**: 311-322), auf das sich das Virus während seiner Vermehrung in der Pflanze beschränkt. Expression eines mutierten pr17-Proteins in transgenen Kartoffelpflanzen bewirkt Breitbandresistenz gegen die wichtigsten Kartoffelviren (Tacke (1996), Nature Biotechnology **14**: 1597-1601). Zugleich wurde jedoch im Zuge dieser Erfindung beobachtet, daß die Expression von WT und mutierten PLRV-TPs in transgenen Kartoffel- und Tabakpflanzen zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentrationen von Zuckern (Sucrose, Fruktose, Glucose) und Zuckerderivaten wie Stärke führt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung.

Besonders gute Ergebnisse im Sinne dieser Erfindung wurden gefunden, wenn eine Variante des pr17-Gens verwendet wurde, die eine N-terminale Verlängerung trägt (pr17-N). In einem Ausführungsbeispiel wurde zum 5'-Ende des pr17-WT-Gens der Polylinker (multiple cloning site; MCS) des Bluescript-Vektors translational fusioniert und durch gezielte Mutagenese sowohl die beiden ersten AUG-Translationskodons von pr17 in ACG-Kodons mutiert und ein AUG-Translationsstartkodon in die Polylinkersequenz eingeführt (Figur 1). Diese Veränderung resultiert in der Expression eines Derivates (pr17-N) des pr17-WT-Proteins mit einer hydrophilen Verlängerung durch die Sequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS (SEQ ID NO: 1) am Aminoterminal (Tacke u.a., 1996, op. cit.; Figur 2). Solche transgenen Kartoffelpflanzen zeigen im Gewächshaus-Test Breitbandresistenz gegen die Kartoffelviren PLRV, PVY und PVX sowie eine erhöhte Konzentration an Zuckern und Zuckerderivaten.

Zur Expression in Pflanzen wurde dieses Gen unter die transkriptionelle Kontrolle des 35S-Promotors und -Terminators des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) im Vektor

pRT103 gebracht (Töpfer (1987), Nucleic Acids Res. **15**: 5890) und diese Transkriptionseinheit (Figur 1) anschließend in den binären Pflanzentransformationsvektor pBIN19 integriert (Bevan (1984), Nucleic Acids Res. **12**: 8711-8721). Dieser Vektor wurde in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm LBA4404 (pAL4404) übertragen (Hoekema (1983), Nature **303**: 179-180), der zur Transformation von *Solanum tuberosum* Var. Linda eingesetzt wurde. Vier (L4, L6, L7 und L8; siehe auch Tacke (1996), op. cit.) der unabhängigen transgenen Kartoffellinien sowie die Ausgangskartoffelsorte Linda wurden für die weiteren Versuche zur induzierten Toleranz ausgewählt.

Wie bereits vorstehend erwähnt, umfaßt in einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung die hydrophile Verlängerung die Aminosäuresequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS.

In einer anderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung stammen die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus Getreide oder Gemüse bzw. sind Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen oder Gemüsepflanzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist die Erhöhung der Toleranz der Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans*.

Als ein überraschender Befund gemäß dieser bevorzugten Ausführungsform wurde gefunden, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene transgene Linien sich auch durch eine statistisch signifikante Toleranz gegen *Phytophthora infestans*, den Erreger der Kraut- und Knollenfäule, auszeichnen.

Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhte Salzkonzentrationen und/oder extreme Temperatur (Hitze, Kälte), wobei man

- (a) eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit einer Nukleinsäure transfiziert, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ferner

- (b) eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erzeugt man

- (c) im Anschluß an Schritt (b), ferner weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der in (b) gewonnenen Pflanze.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV) Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung.

Wie bereits vorstehend erwähnt, umfaßt in einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die hydrophile Verlängerung die Aminosäuresequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS.

In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens stammen die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus Getreide oder Gemüse bzw. sind Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen bzw. Gemüsepflanzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Erhöhung der Toleranz der Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans*.

Die Figuren zeigen:

#### **Figur 1**

Herstellung des Plasmids p17N. Durch spezifische Mutagenese wurden die beiden AUG-Kodons des Wildtyp pr17-Gens in ACG mutiert und ein Translations-Initiationskodon in die Polylinkersequenz eingeführt.

#### **Figur 2**

Nukleotid und Aminosäuresequenz des mutierten pr17N-Gens bzw. -Proteins.

#### **Figur 3**

Ergebnis des Resistenztests #1 (im Gewächshaus) mit je 5 Pflanzen der Ausgangssorte Linda (L) sowie der pr17N-transgenen Linien L4, L6, L7 und L8.  
A. Gesamtansicht des Versuchs. B. Ansicht je einer Pflanze pro Linie.

#### **Figur 4**

Ergebnis des Resistenztests #2 (in der Phytokammer) mit je 6 Pflanzen der Ausgangssorte Linda (L) sowie der pr17N-transgenen Linien L4, L6, L7 und L8.  
A. Teilansicht des Gesamtversuchs. B. Ansicht ausgewählter Pflanzen

#### **Figur 5**

Bonitur des Befalls von Blattscheiben im Labortest mit *P. infestans* Rasse 1-11 (Versuch #2) nach 9, 10 und 13 Tagen nach der Infektion (dpi).

#### **Figur 6**

Kumulative Darstellung zweier Versuche der Infektion von Kartoffel-Blattscheiben mit *P. infestans* Rasse 1-11.



**Figur 7**

Habitus der nicht-transgenen Kartoffelsorte Linda (L) und der 4 transgenen Linien L4, L6, L7 und L8 nach 5 Wochen bei 100 mM NaCl. Einzelne Pflanzen des Teilversuchs (A) wurden zur besseren Darstellung in (B) abgebildet. In der Ausgangssorte Linda sind die unteren Blätter abgestorben.

**Figur 8**

Habitus einzelner Pflanzen der nicht-transgenen Kartoffelsorte Linda (L) und der 4 transgenen Linien L4, L6, L7 und L8 nach 5 Wochen bei 100 mM NaCl. In der Sorte Linda sind deutlich noch Reste der abgestorbenen unteren Blätter sowie die Veränderungen des Stengels zu erkennen.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

**Beispiel 1: Herstellung des Plasmids p17N**

Eine Modifikation am 5'-Ende des pr17-Gens (ORF4) wurde durch translationale Fusion der multiple cloning site des Bluescript-Vektors, Einführung eines optimierten Translationsinitiationskodons sowie Mutation der beiden pr17-WT AUG-Initiationskodons zu ACG erreicht (Figur 1). Diese Veränderung resultiert in der Expression eines Derivates (pr17-N) des pr17-WT-Proteins mit einer hydrophilen Verlängerung durch die Sequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS am Aminoterminal (Tacke (1996), op. cit.; Figur 2). Die Herstellung des Plasmids p17N ist beschrieben in Schmitz (1996), Nucleic Acids Res. **24**: 257-263 (dort bezeichnet als p17/NIII).

**Beispiel 2: Einführung der T-DNA in den Empfängerorganismus**

Nach Transformation von *E. coli* S17-1 Zellen und Mating mit dem *A. tumefaciens* Stamm LBA 4404 (pAL 4404) (Hoekema *et al.*, 1983) wurden Agrobakterien, die das Plasmid p17N trugen, zur Pflanzentransformation eingesetzt. Blätter von *S. tuberosum* var. Linda aus der Sterilkultur wurden an der Basis abgeschnitten und 10 min in flüssigem MS-Medium mit einer über Nacht gewachsenen Agrobakterien-

Kultur inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation auf festem MS-Medium wurden die Blätter abgewaschen und auf Selektions-, Regenerationsmedium ausgelegt. Dieses bestand aus MS-Medium komplementiert mit 0,02 mg/l Naphtylelessigsäure, 0,02 mg/l Giberellinsäure, 2 mg/l Zeatinribosid, 500 mg/l Claforan und 100 mg/l Kanamycinsulfat. Sprosse bildeten sich nach 6-8 Wochen und wurden zur Wurzelbildung auf MS-Medium mit 250 mg/l Claforan und 150 mg/l Kanamycinsulfat umgesetzt.

### **Beispiel 3: Charakterisierung der erhaltenen transgenen Linien**

Die Expression des N-terminal modifizierten PLRV 17K TP wurde im Western blot mit Hilfe 17K-spezifischer Antiseren nachgewiesen wie in Tacke u.a., 1996 (op. cit.) beschrieben. Dazu wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial hergestellt, die Proteine auf einem 12.5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membranen überführt und mit einem 17K-spezifischen Antikörper inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper geschah nach bewährten Verfahren durch Inkubation mit Schaf-Anti-Kaninchen-IgG/Peroxidasekonjugat und dem Peroxidasesubstrat des ECL-Kits (Amersham).

### **Beispiel 4: Resistenztests mit *Phytophthora infestans***

Zur Ermittlung der quantitativen Resistenz wurden im Labor Befallstests mit dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule, *Phytophthora infestans*, durchgeführt. Als Inokulum wurde die Rasse 1-11 des Pathogens verwendet (diese Rasse wird zur Erhaltung auf Blattmaterial der Kartoffelsorte Désirée kultiviert). Dazu wurden Kartoffelblättchen in einer Bewässerungsbox (Gieffers (1989), J. Phytopathology **126**: 115-132), die eine permanente Wasserversorgung ermöglicht, mit dem Erreger inokuliert und unter 10°C ausgelegt. Die Lichtversorgung erfolgte mit 10 Röhren des Typs Osram, L16, W/25 Weiß Universal für 16 h täglich mit einer mittleren photoperiodisch aktiven Strahlung von ca.  $100 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ . Die nach 8-10 Tagen gebildeten Sporangien wurden von den Blättchen mit Wasser abgespült. Der Anteil lebender Sporangien wurde mit der Färbemethode nach Behr (Behr (1955),

Zentralblatt für Bakt. Etc. II **108**: 23/24, 641-656) ermittelt. Für Befallstests wurde eine Suspension mit einer Sporangien-dichte von  $10^4 \text{ ml}^{-1}$  verwendet.

In Anlehnung an den Test nach Hodgson (Hodgson (1961), American Potato Journal **38**: 259-264) wurde ein neues Prüfverfahren entwickelt. Mittels einer für den Test entwickelten Stanze werden Blattscheiben von 20 mm Durchmesser hergestellt. Das Stanzverfahren arbeitet druckarm, so daß die Blattränder nicht gequetscht und Nekrosen sowie bakterielle Fäulen vermieden werden.

Die Blattscheiben werden in Bewässerungsboxen (Gieffers et al., op. cit.) auf Filterpapier mit der Unterseite nach oben ausgelegt. Der ständige Wasserfilm auf dem Filterpapier versorgt die Blattscheiben ausreichend mit Wasser. Zur Inokulation wird ein Tropfen mit einer Sporangiensuspension (200 Sporangien/20µl) auf die Blattscheibenmitte pipettiert.

Die inokulierten Blattscheiben werden unter einer Dauertemperatur von 10°C und den o.g. Lichtbedingungen inkubiert. Unter diesen Bedingungen schlüpfen die infektiösen Zoosporen. Nach ca. 6 Tagen werden die ersten Sporangien gebildet, die Befallsbonitur erfolgt nach 8 bis 10 Tagen.

Der Blattscheibenbefall, sichtbar durch Sporangienrasenbildung und Blattgewebezerfall, wird prozentual eingeschätzt.

Eine wichtige Voraussetzung für den Test besteht darin, daß die zu prüfenden Kartoffelpflanzen unter gleichen Bedingungen kultiviert und die Blattscheiben von Blättchen gleicher Blattetagen und gleicher Blattstellung gewonnen werden.

Auf diese Weise kann der quantitative Befall von Gewächshaus- wie Freilandmaterial geprüft werden. Die Befallshöhe entscheidet über den quantitativen Resistenzgrad.

#### **Beispiel 5: Induzierte Toleranz gegen Trockenheit als Beispiel für erhöhte Toleranz gegen abiotischen Streß**

Jeweils 5 bzw. 6 Pflanzen der transgenen Linien L4, L6, L7 und L8 sowie die Ausgangssorte Linda wurden im 6-8Blatt-Stadium für 8 Wochen unter Trockenstreß gehalten, wobei nach 3 und nach 6 Wochen die Pflanzen je einmal gewässert wurden. Die transgenen Pflanzen zeigten dabei in zwei unabhängigen Experimenten

eine deutlich erhöhte Toleranz gegen Wasserstreß, wie aus Tabelle 1 und den Figuren 3 und 4 hervorgeht. Tabelle 1: Auswertung der Kartoffellinien L4, L6, L7 und L8 sowie der Ausgangssorte Linda nach 8 Wochen Wasserstreß

Linie / Sorte # überlebende Pflanzen / # der untersuchten Pflanzen

	Exp. 1**	Exp. 2***
Linda	1*/5	1*/6
L4	4/5	6/6
L6	5/5	6/6
L7	5/5	6/6
L8	5/5	5/6

\* die überlebende Pflanze entwickelt aus der Knolle einen neuen Sproß; alle ursprünglichen Pflanzenteile sind tot im Gegensatz zu den überlebenden Pflanzen der transgenen Linien L4, L6, L7 und L8.

\*\* Dieser Versuch wurde unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus durchgeführt.

\*\*\* Dieser Versuch wurde unter kontrollierten Bedingungen in einer Phytokammer durchgeführt.

#### **Beispiel 6: Induzierte Toleranz gegen *Phytophthora infestans* als Beispiel für erhöhte Toleranz gegen Pilzbefall**

Zwei unabhängige Befallsversuche mit *P. infestans* wurden mit den Rassen 1-11 auf Blattscheiben von Gewächshausmaterial durchgeführt. Dabei wurden von 8 Pflanzen pro transgene Linie und Ausgangssorte Linda je 8 Blattscheiben zur Infektion im

Labortest verwendet. Das Inokulum enthielt 200 Sporangien pro 20 µl Wasser; die Inkubation der Blattscheiben erfolgte bei 10°C und Bonituren wurden nach 9, 10 und 13 Tagen nach der Infektion (dpi) vorgenommen. Alle 4 transgenen Linien zeigten gegenüber *P. infestans* bis 10 dpi signifikant geringeren Befall. Danach nahm der Befall bei L7 und L8 schnell zu, während L6 und besonders L4 weiterhin ihr relativ geringeres Befallsniveau beibehielten (Figur 5). Im Mittel beider Versuche ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Resistenzverhalten der 4 getesteten transgenen Lindalinien im Vergleich zur nichttransgenen Ausgangssorte Linda (Figur 6).

### **Beispiel 7: Induzierte Toleranz gegen Salz als weiteres Beispiel für erhöhte Toleranz gegen abiotischen Streß**

In einer Versuchsreihe von jeweils 4 Pflanzen der Linien L4, L6, L7 und L8 sowie der nicht-transgenen Ausgangssorte Linda (L) wurden die Kartoffelpflanzen in Granulat für 5 Wochen unter Salzstreß gehalten, wobei Salz in Form von NaCl in Konzentrationen von 10, 25, 50, 75, 100, 200, 400 und 1000 mM im Gießwasser enthalten war. Die höchste Konzentration von 1000 mM verursachte bei allen Pflanzen nach 2 Wochen starke Schäden und diese Pflanzen waren nach 5 Wochen tot, während die transgenen Linien, nicht jedoch die Sorte Linda, eine Salzkonzentration von 400 mM trotz starker Schäden überlebten. Wie in den Figuren 7 und 8 für die Bewässerung mit 100 mM NaCl nach 5 Wochen dargestellt, hatten alle transgenen sowie alle nicht-transgenen Pflanzen einen ähnlichen Phänotyp (die etwas geringere Wuchshöhe der transgenen Linien wie in Figur 7B ersichtlich resultiert aus der gentechnischen Veränderung, nicht aus dem Salzstreß): Bei der nicht-transgenen Ausgangssorte Linda sind die unteren Blätter abgestorben und der Stengel weist charakteristische, krankhafte Veränderungen auf (starke Verengung, Braunfärbung), wie auch aus Figur 8 hervorgeht, während bei allen transgenen Linien die Stengel unverändert grün (Figuren 7, 8) und alle Blätter erhalten sind (Figur 7A,B). Allenfalls kommt es zu vereinzelt Nekrosen auf den unteren Blättern (Figur 8). Trotz des Salzstreß bilden sich an allen Pflanzen Blüten und es kommt zur Knollenbildung (Figur 8).

### PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung einer Nukleinsäure, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert, zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhte Salzkonzentrationen und/oder extreme Temperatur (Hitze, Kälte).
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei ferner eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert wird.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei, im Anschluß an die Regeneration, ferner weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der regenerierten Pflanze erzeugt werden.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein ist.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV) Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei die hydrophile Verlängerung die Aminosäure MAELSGSGSELHRGGGRSRTS ist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus Getreide oder Gemüse stammen bzw. Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen bzw. Gemüsepflanzen sind.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Erhöhung der Toleranz von Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine Erhöhung der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans* ist.
10. Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhte Salzkonzentrationen und/oder extreme Temperatur (Hitze, Kälte), wobei man (a) eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit einer Nukleinsäure transfiziert, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei man ferner (b) eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei man, im Anschluß an Schritt (b) ferner (c) weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der in (b) gewonnenen Pflanze erzeugt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein ist.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV) Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die hydrophile Verlängerung die Aminosäure MAELSGSGSELHRGGGRSRTS ist.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16, wobei die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus Getreide oder Gemüse stammen bzw. Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen oder Gemüsepflanzen sind.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, wobei die Erhöhung der Toleranz von Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine Erhöhung der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans* ist.



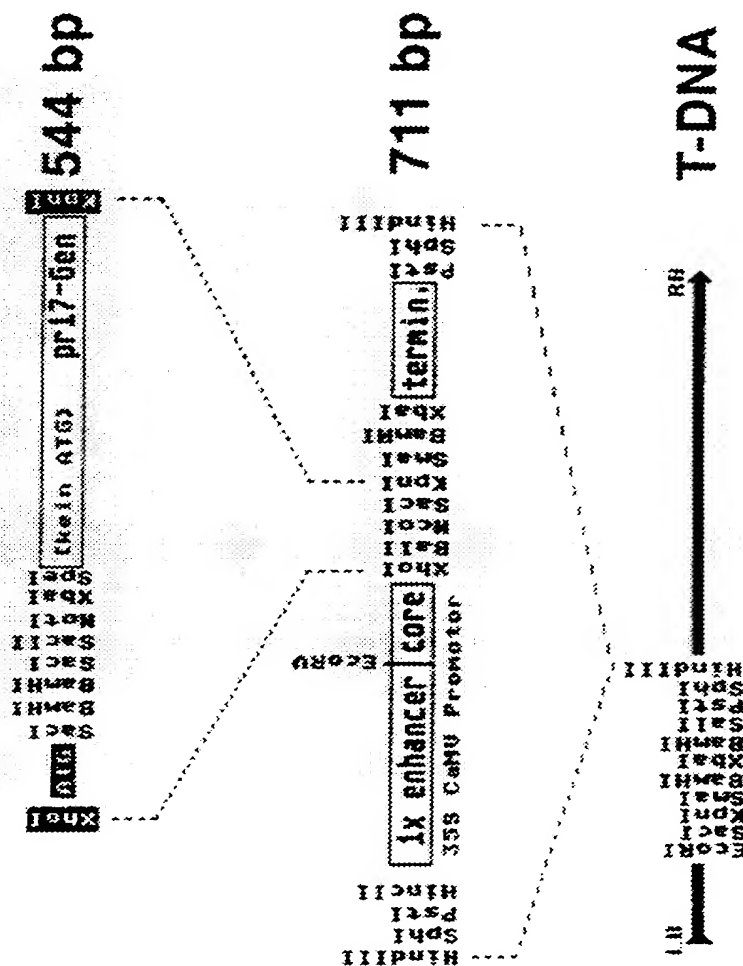


Fig. 1



XbaI  
 CTGGAG  
 AACATGGCAGAGCTCGGATCCGGATCCGAGCTCCACCGCGGTGGCGCCGCTCTAGGACT  
 M A E L G S G S E L N R G G R S R T  
 AGTACGTCAGCCGCTGTGTACACACACACACAGGAGGCGCAAGGCAATCCCTTCGCGAGGCG  
 S T S T U U V N N Q G G E E G N F F G G A  
 CCGTAACAGAGATTCAGCCAGTGGTTAIGGTCACCGGCTCTGCGCACCCAGGCGCGGAGA  
 L T E F S Q N L M S R P L G N F G E D  
 CGTAGAGAGGAGGCAATCGCGCTCAGAGAGACTGGAGTCCCGAGGACGAGGCTCA  
 U E E E A I A A Q E E L E F F E D E R Q  
 GCGAGGCAATTCGTGTTACAGAGGACACACCTCATGGGCAACCTCCAGGAGATTTTACCTT  
 R N N S C L Q R T T S M A T P K E U S P S  
 CCGGCCGATCTATCAGACTGTCCGGCATTCAGGATGGAATAGTCAAGGCTACCATGAG  
 G R U V R T U R H S R M E V S R P T M S  
 TATAGATCACAAGGCAATCTACCTTCAGTTCTGTCAGCGAGGCTCTTCCACCTTCCTCGGCT  
 I R S Q A S V F S S S A R P L P P P A  
 CCATCGCTTATGATGGTTGGACCCCGATTCAGAGATATCATCCCTCAGTCTACGTCACAA  
 P S L M S N T P T A K V N P S S P T S T S  
 GTTCCAAATTCAGAGGCGCGCCCAAGACTTATCAGGCGGGAATATAGGTTAGC  
 S K L R R A R P K L I K R G + + KpnI

Fig. 2



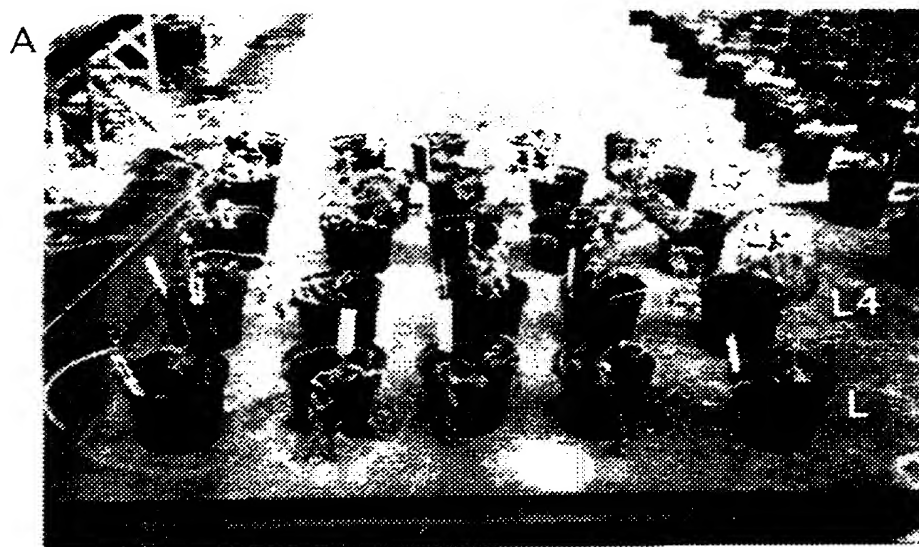


Fig. 3



A



B

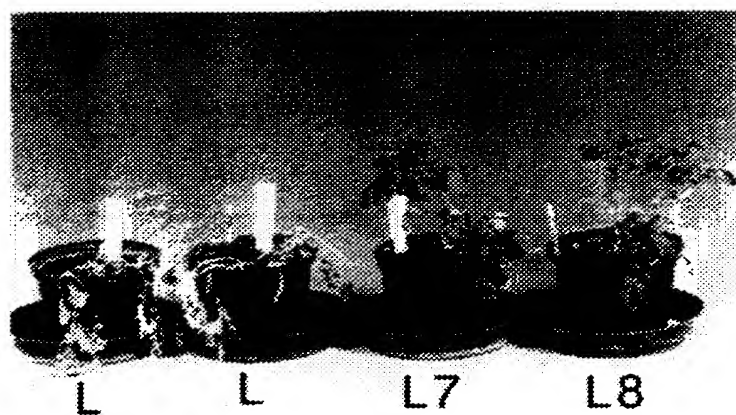


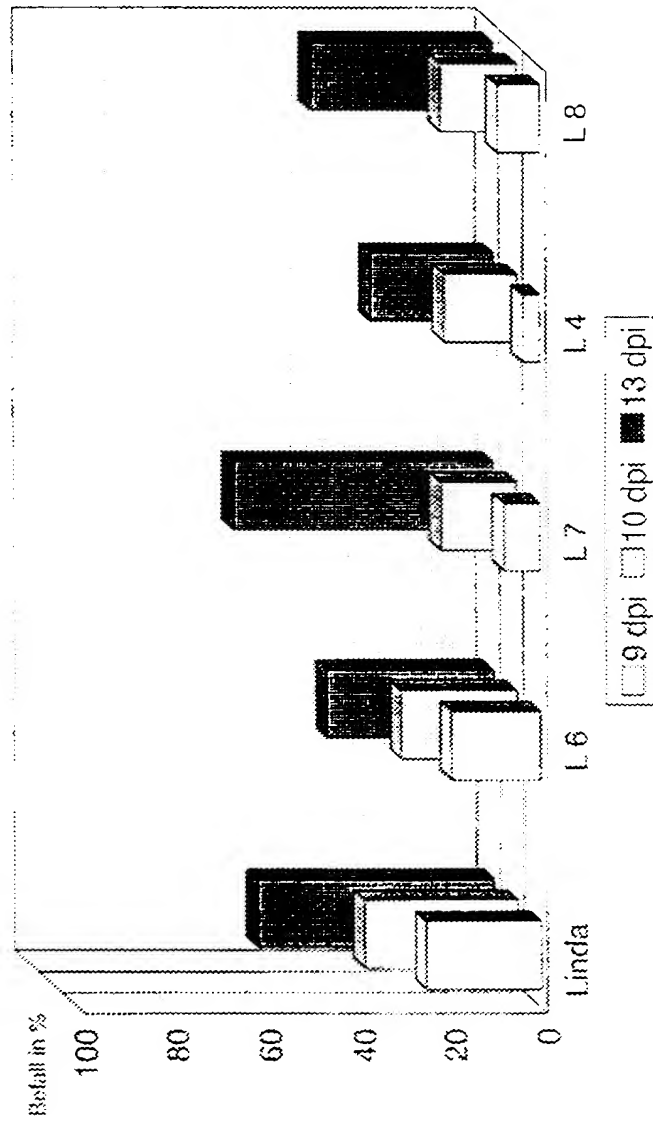
Fig. 4





Phytophthora infestans-Befall auf Linda u.a.

Laborfest, (t 1-1)



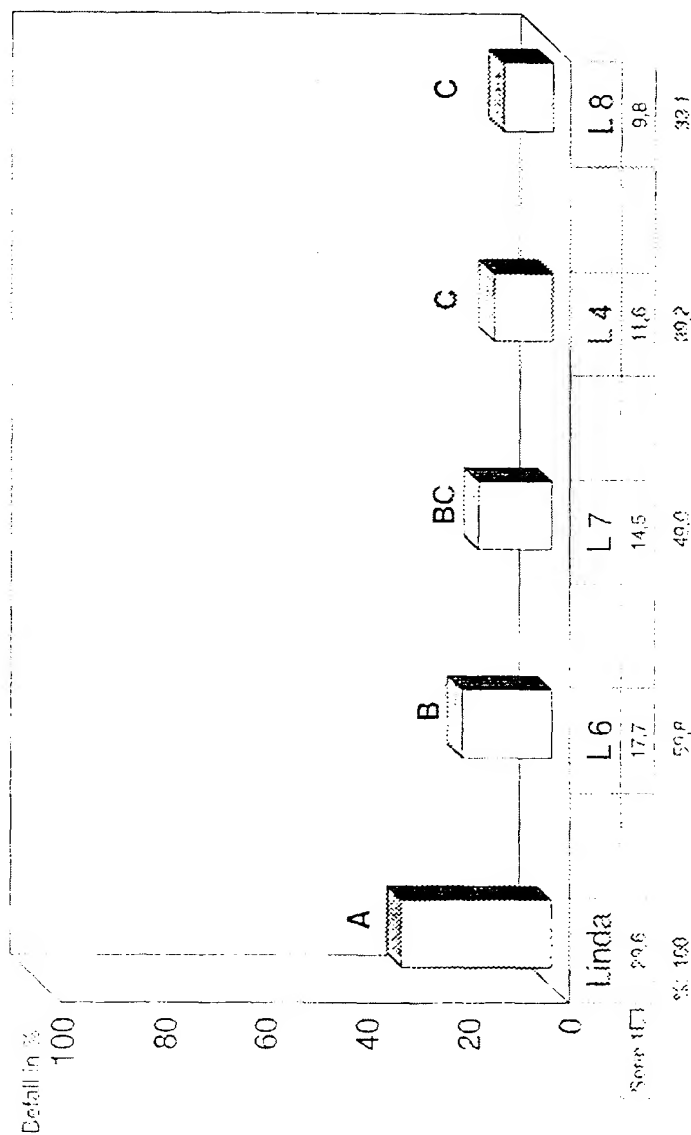
Linda2.doc  
Grafik LPH.ch

Figur 5

2 Versa L. Oktober 2007



Phytophthora infestans-Befall auf Linda u.a.  
Labortest, R 1-11



Figur 6

Mittelwerte von 3 Versuchsreihen, Aug. 1997, 1998, 1999  
Wiederholtest, Gültigkeit: Bonferroni-Test,  $p < 0,05$

Lindt/W. doc  
Gießler MPI Köln





Fig. 7





Fig. 8





Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference B 2729 PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/03291	International filing date (day/month/year) 12 May 1999 (12.05.99)	Priority date (day/month/year) 13 May 1998 (13.05.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82, 15/29, C07K 14/415		
Applicant MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN, E.V.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.	
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I	<input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II	<input type="checkbox"/> Priority
III	<input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	<input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V	<input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	<input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII	<input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII	<input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06 December 1999 (06.12.99)	Date of completion of this report 23 August 2000 (23.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP  Facsimile No.	Authorized officer  Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/03291

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

☐ the international application as originally filed.

☒ the description, pages 1-17, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the claims, Nos. 1-18, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

☒ the drawings, sheets/fig 1/8-8/8, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages \_\_\_\_\_

☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_

☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/03291

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1 - 4, 8, 10 - 13, 17	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1 - 18	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1 - 18	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

D1: WO-A-97/06669 (UNIV CALIFORNIA), 27 February 1997  
(1997-02-27)

D2: HERBERS, K. ET AL.: "Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves", THE PLANT JOURNAL, Vol. 12, No. 5, 1997, pages 1045 to 1056, XP002125082, cited in the application.

1. D1 is considered prejudicial to the novelty of the general Claims 1 to 4, 8, 10 to 13 and 17. That document describes methods of producing transgenic plants, namely by means of a gene which codes for a polypeptide that interacts with plasmodesmata. This method is used to influence the size of plants, it being established that high temperatures scarcely influence these genetically modified plants (page 5, lines 22 to 30; page 34, lines 32-33; and Claim 25).

This means that the use of nucleic acids that code for a polypeptide having affinity for plasmodesmata to produce plants having increased tolerance to heat is derived from D1.



2. The use of the nucleic acids mentioned in Claims 1 to 18 for producing plants having increased tolerance to heat or cold is not considered inventive. The description does not show that this object has actually been solved.

The parts of Claims 5 to 9, 14 to 16 and 18 that concern the production of plants having increased tolerance to dryness, fungal infection or increased salt concentration (using transport protein Pr 17) can be recognized as novel and inventive. Although D2, which represents the closest prior art, describes transport protein 17 from the potato leaf virus and its use in producing transgenic plants, that document does not indicate that plants having the above properties can be produced.





# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 99/03291

## VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The application does not mention any plants which actually display increased tolerance to heat or cold. Therefore Claims 1 to 18 do not meet the requirements of PCT Article 5.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 99/03291

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

General Claims 1 to 4, 8 to 13, 17 and 18 lack an essential inventive feature, namely the definition of the polypeptide which codes for an affinity for plasmodesmata. The generalization to any proteins having affinity for plasmodesmata is not acceptable since the description does not show that other proteins may also have the claimed effects on plants (PCT Article 6 in conjunction with PCT Article 5).

